

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА И 3-ГИДРОКСИПИРИДИНА В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЭРИТРОЦИТОПОЭЗА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ДОКСОРУБИЦИНА И ЦИКЛОФОСФАМИДА У КРЫС СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ ОПУХОЛЕВЫМ ПРОЦЕССОМ

**Соловьева М.А.¹, Сипров А.В.¹, Агеев В.П.¹, Шмырева Н.В.¹, Макарова М.Ю.¹,
Вашуркина И.М.¹, Шубин Д.Ю.¹, Кечемайкина М.И.¹**

¹ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: alek-s13@mail.ru

Проведен анализ влияния дериватов пиримидина и 3-гидроксипиридина – ксимедона и мексидола – в составе липосом в сравнении со свободной формой этих средств на содержание эритроцитов и гемоглобина крови и костномозговые показатели эритроцитопоэза при использовании липосомальной комбинации «доксорубин + циклофосфамид» у крыс с карциномой Walker-256. Исследование проводили на 168 крысах линии Вистар массой 160–270 г. Липосомальную комбинацию «доксорубин (4 мг/кг) + циклофосфамид (45 мг/кг)» вводили внутривенно однократно. Липосомальную и свободную форму ксимедона (50 и 100 мг/кг) и мексидола (25 и 50 мг/кг) вводили внутривенно со дня проведения химиотерапии в течение 5 суток. Исследуемые параметры анализировали на 3-и и 7-е сутки после химиотерапии. Установлено, что липосомальные ксимедон и мексидол не имеют преимуществ перед свободной их формой в коррекции угнетения липосомальными цитостатиками эритроцитопоэза. При этом раздельное применение ксимедона и мексидола (в липосомах и свободной форме) не снижало тяжести анемии. Наибольшую эффективность показала комбинация липосомальных ксимедона (50 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг) в виде снижения тяжести анемии на 7-й день после химиотерапии с увеличением уровня гемоглобина (на 33,6%) и эритроцитов (на 43,4%) в периферической крови в сочетании с ростом доли базофильных (в 3 раза) и полихроматофильных нормобластов (на 80%) в костном мозге экспериментальных крыс.

Ключевые слова: липосомы, доксорубин, циклофосфамид, ксимедон, мексидол, эритроцитопоэз.

THE EFFECT OF PYRIMIDINE AND 3-HYDROXYPYRIDINE DERIVATIVES IN LIPOSOMES ON ERYTHROCYTOPOIESIS INDICATORS IN RATS WITH MALIGNANT TUMOR PROCESS TREATED WITH LIPOSOMAL DOXORUBICIN AND CYCLOPHOSPHAMIDE

**Soloveva M.A.¹, Siprov A.V.¹, Ageev V.P.¹, Shmyreva N.V.¹, Makarova M.Y.¹,
Vashurkina I.M.¹, Shubin D.Y.¹, Kechemaykina M.I.¹**

¹N.P. Ogarev Mordovia State University, Saransk, e-mail: alek-s13@mail.ru

We have analyzed the comparative effect of pyrimidine and 3-hydroxypyridine derivatives – xymedon and mexidol in liposomes and free forms of them on the number of blood erythrocytes and hemoglobin and erythropoiesis indicators of bone marrow in rats with Walker-256 carcinoma treated with liposomal doxorubicin and cyclophosphamide. The study was carried out in 168 Wistar rats weighing 160–270 g. The liposomal combination of doxorubicin (4 mg/kg) and cyclophosphamide (45 mg/kg) was injected once intravenously. Liposomal and free forms of xymedon (50 and 100 mg/kg) and mexidol (25 and 50 mg/kg) were injected intravenously for 5 days starting from day of the chemotherapy. The studied parameters were analyzed on days 3 and 7 after chemotherapy. We have established that liposomal xymedon and mexidol have no advantages in correction of liposomal cytostatic-induced erythropoiesis suppression in comparison with free form of studied medications. At the same time the separate use of liposomal and free forms of xymedon and mexidol did not reduce anemia severity. The combination of liposomal xymedon (50 mg/kg) and mexidol (25 mg/kg) showed the greatest efficiency in erythropoiesis suppression elimination. It manifested by a decrease of anemia severity on day 7 after chemotherapy with increase in hemoglobin level (by 33.6%) and erythrocytes number (by 43.4%) of peripheral blood in combination with increase in basophilic normoblasts (3 times) and polychromatophilic normoblasts (by 80%) share in the bone marrow of experimental rats.

Keywords: liposomes, doxorubicin, cyclophosphamide, xymedon, mexidol, erythropoiesis.

Миелосупрессия является основной дозоограничивающей токсичностью в лечении рака, однако миелотоксические режимы остаются текущим стандартом лечения больных раком молочной железы [1]. Одним из проявлений миелотоксичности цитостатиков служит эритроцитопения с усилением анемии, часто обусловленной самим опухолевым процессом [2]. Причинами усиления цитостатиками анемии часто являются снижение или нарушение выработки эритроцитов и высокая скорость их разрушения или снижение выживаемости [1]. Применение липосомальных форм цитостатиков позволяет в некоторой степени снижать их токсическое действие на здоровые органы и ткани [3], но не решает проблему гематотоксичности. Имеющиеся опасения в отношении способности рекомбинантного человеческого эритропоэтина вызывать рост опухолей и повышать риск венозной тромбоэмболии привели к тому, что значительно меньше онкологических больных получают терапию препаратами эритропоэтина для лечения миелосупрессивной химиотерапии [4]. Известна важная роль окислительного стресса, индуцированного цитостатиками, в развитии гематологической токсичности, в том числе при повреждении эритроцитов. Реорганизация мембраны эритроцитов, индуцированная окислительным стрессом, ведет к нарушению их деформационных характеристик, снижает оксигенацию здоровых тканей и способствует прогрессированию опухоли [1]. Таким образом, остается актуальным поиск наиболее эффективных средств защиты эритропоэза, особенно среди средств, обладающих антиоксидантной активностью. В литературе имеются позитивные данные о применении липосомальных антиоксидантных средств при разных патологических состояниях [5, 6], но степень эффективности липосомальных форм дериватов пиримидина и 3-гидроксипиридина в минимизации эритропоэзсупрессивной активности цитостатиков ранее не оценивалась.

Цель исследования – изучить эффективность липосомальных дериватов пиримидина и 3-гидроксипиридина – ксимедона и мексидола – в минимизации эритропоэзсупрессивного действия липосомальной комбинации «доксорубин + циклофосфамид» и сопоставить полученные результаты с таковой эффективностью свободной формы указанных дериватов у крыс с карциномой Walker-256.

Материал и методы исследования. Экспериментальную работу выполняли на 168 самках-крысах линии Вистар массой 160–270 г из питомника «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Условия содержания животных (в виварии Мордовского государственного университета) включали естественный режим света и кормления, свободный доступ к воде и пище. Все манипуляции с животными выполняли согласно правилам «Руководства по уходу и использованию лабораторных животных» (Guide for the care and use of laboratory animals) [7]. Моделирование неопластического процесса осуществляли введением взвеси клеток карциномы Walker-256 (W-256) (10^6 клеток) под кожу хвоста. Официальную лекарственную

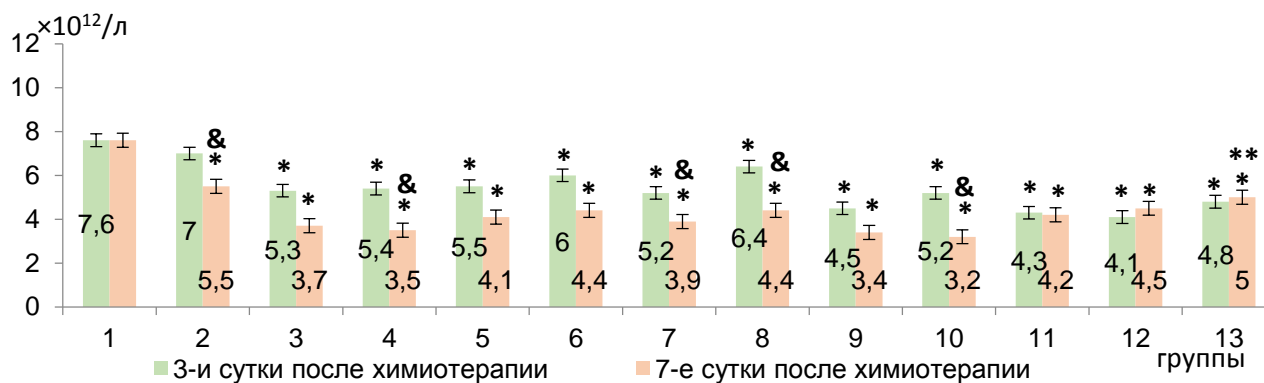
форму (порошок во флаконах) доксорубина («Pharmachemie», Нидерланды) применяли как 0,04%-ный раствор, а циклофосфамида («Baxter oncology», Германия) – как 0,45%-ный раствор на изотоническом растворе натрия хлорида. Субстанцию ксимедона («Кристалл», Россия) применяли 10%-ным раствором на изотоническом растворе натрия хлорида, а официальную форму мексидола («Фармасофт», Россия) – в виде 5%-ного водного раствора. Липосомы получали методом обращения фаз из лецитина и холестерина. Препараты инкапсулировались пассивной загрузкой. Создание липосом осуществляли с применением роторного испарителя (Heidolph, Германия) и экструдера (LIPEX, Канада). Очистку липосом от свободных фракций выполняли с помощью диализа в атмосфере инертного газа. Характеристики липосомальных частиц оценивались на спектрофотометре Shimadzu (Япония) и анализаторе размеров наночастиц NANO-flex (США). Концентрация доксорубина, циклофосфамида, ксимедона и мексидола в липосомах определялась методом УФ-спектрофотометрии с расчетом степени включения препаратов. Концентрация доксорубина и циклофосфамида в липосомах соответствовала 1,86 мг/мл и 21 мг/мл соответственно, ксимедона – 50 мг/мл и 100 мг/мл, мексидола – 25 мг/мл и 50 мг/мл.

Животные были распределены на 13 групп по 12–14 крыс в каждой: в 1-ю группу входили интактные крысы, во 2-ю – крысы с перевитой карциномой Walker-256 (W-256), не получающие лекарственную терапию; в 3-ю – крысы с W-256, получающие доксорубин (4 мг/кг) и циклофосфамид (45 мг/кг) в свободной форме однократно в боковую хвостовую вену на 11-е сутки после введения опухолевых клеток; в 4-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальную комбинацию доксорубина (4 мг/кг) + циклофосфамид (45 мг/кг) однократно внутривенно на 11-е сутки после введения опухолевых клеток; в 5-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики (как в 4-й группе) и липосомальный ксимедон (50 мг/кг) внутривенно ежедневно с начала применения цитостатиков, в течение 5 суток; в 6-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и липосомальный ксимедон (100 мг/кг) внутривенно ежедневно с начала применения цитостатиков в течение 5 суток; в 7-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и липосомальный мексидол (25 мг/кг) внутривенно ежедневно с начала введения цитостатиков в течение 5 суток; в 8-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и липосомальный мексидол (50 мг/кг) внутривенно ежедневно с начала применения цитостатиков в течение 5 суток; в 9-ю и 10-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и «свободный» ксимедон в дозах 50 и 100 мг/кг соответственно внутривенно ежедневно с начала применения цитостатиков в течение 5 суток; в 11-ю и 12-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и «свободный» мексидол в дозах 25 мг/мл и 50 мг/кг в

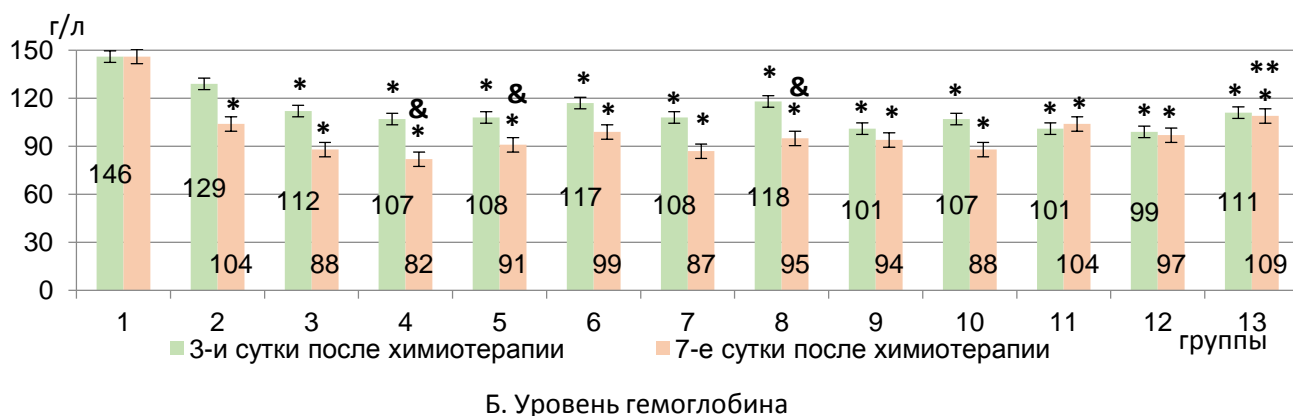
соответствующих группах внутривенно ежедневно с начала введения цитостатиков в течение 5 суток; в 13-ю – крысы с карциномой W-256, получающие липосомальные цитостатики и липосомальные ксимедон (50 мг/кг) и мексидол (25 мг/кг) внутривенно ежедневно, с начала применения цитостатиков в течение 5 суток.

На 3-й и 7-й день после химиотерапии 6 животных из каждой группы усыпляли посредством тиопентала натрия (50 мг/кг). Количество эритроцитов в крови подсчитывали в камере Горяева. Содержание гемоглобина определяли гемиглобинцианидным методом. Исследование миелограммы по мазкам костного мозга из бедренной кости крыс с подсчетом числа пронормобластов, базофильных, полихроматофильных и оксифильных нормобластов проводилось методом световой микроскопии. Статистическую обработку проводили с расчетом средних арифметических значений (M) и их ошибок (m). Достоверность различий в группах рассчитывали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Применение комбинации «доксорубин + циклофосфамид» у крыс с карциномой W-256 (в 3-й группе) приводило на 3-й день после химиотерапии к усилению анемии: уровень эритроцитов и гемоглобина снижался на 30% и 23% соответственно относительно интактных крыс ($p < 0,05$). Идентичные изменения были отмечены при использовании липосомальной комбинации «доксорубин + циклофосфамид» (в 4-й группе) (рис. 1).



А. Количество эритроцитов

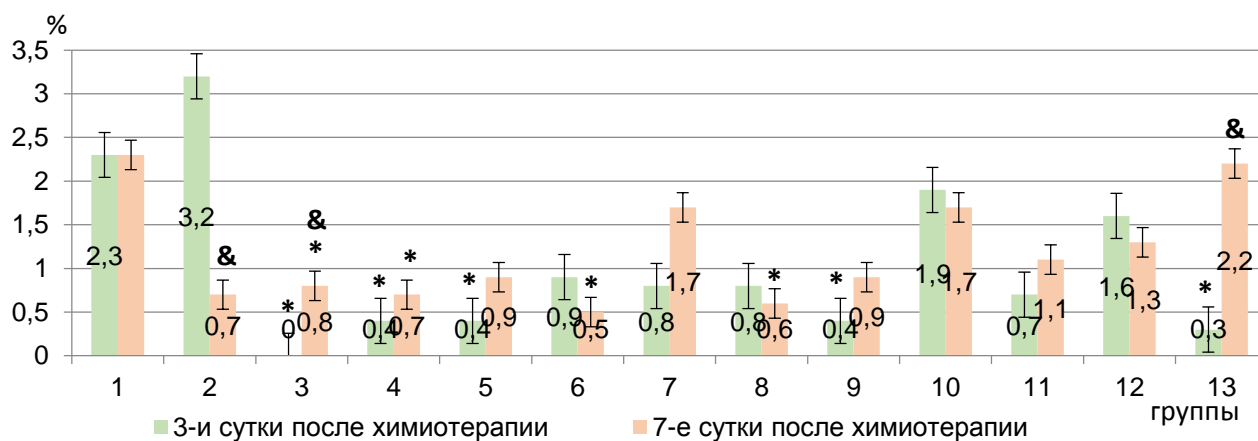


Б. Уровень гемоглобина

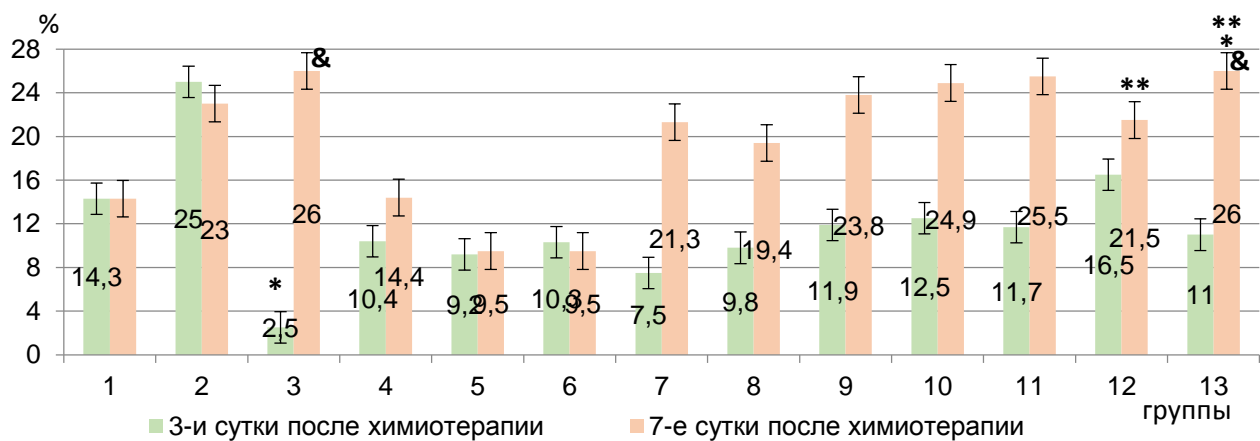
Рис. 1. Динамика изменений уровня эритроцитов и гемоглобина в крови крыс с карциномой Walker-256 на фоне воздействия липосомальными ксимедоном и мексидолом и липосомальной комбинацией «доксорубицин + циклофосфамид» (А-Б)

* – достоверные различия в сравнении с интактными крысами ($p < 0,05$);
 ** – достоверные различия в сравнении с группой 4 ($p < 0,05$);
 & – достоверные различия в группе в сравнении с 3-ми сутками ($p < 0,05$).

К 7-му дню в 3-й группе анемия сохранялась на прежнем уровне, а в 4-й группе эритроцитопения усиливалась на 35%, на 18% падал уровень гемоглобина по сравнению с 3-м днем эксперимента ($p < 0,05$, рис. 1). В костном мозге на 3-й день после химиотерапии у животных 3-й группы появлялись пронормобласты, исчезали базофильные нормобласты, а уровень полихроматофильных нормобластов снижался на 82% относительно интактных крыс ($p < 0,05$, рис. 2).



А. Доля базофильных нормобластов



Б. Доля полихроматофильных нормобластов

Рис. 2. Содержание базофильных и полихроматофильных нормобластов в костном мозге крыс с карциномой Walker-256 при применении липосомальных ксимедона и мексидола с липосомальной комбинацией «доксорубицин + циклофосфамид» (А-Б)

* – достоверные различия в сравнении с интактными крысами ($p < 0,05$);

** – достоверные различия в сравнении с группой 4 ($p < 0,05$);

& – достоверные различия в группе в сравнении с 3-ми сутками ($p < 0,05$).

В 4-й группе на фоне появления пронормобластов отмечалось снижение только уровня базофильных нормобластов на 84% ($p < 0,05$) относительно интактных крыс. При этом число базофильных и полихроматофильных нормобластов было в 4 раза достоверно больше, чем в 3-й группе крыс. К 7-м суткам после химиотерапии в обеих группах количество базофильных нормобластов было ниже, чем у интактных животных (на 71% и 75% в 3-й и 4-й группах соответственно, $p < 0,05$), а другие анализируемые показатели эритропоэза уже не отличались от исходных значений (рис. 2). Следовательно, исходя из показателей миелограммы использование комбинации «доксорубицин + циклофосфамид» в составе липосом оказывается первоначально менее агрессивным в отношении эритропоэза, чем применение свободной формы цитостатиков. В то же время усиление эритроцитопении и снижение уровня гемоглобина на 7-е сутки после химиотерапии при использовании липосомальных «доксорубицин + циклофосфамид» в сравнении с 3-ми сутками, вероятно, все же является следствием подавления пролиферации незрелых предшественников эритроцитов. Вероятно, менее выраженное и плавное угнетение эритропоэза сопровождается замедлением развития соответствующих проявлений в периферическом звене эритрона.

Ксимедон в липосомальной и свободной форме в обеих исследуемых дозах не препятствовал развитию анемии на 3-й день после применения цитостатиков. К 7-му дню показатели гемоглобина и эритроцитов в группах с липосомальным и свободным ксимедоном

также не отличались от таковых в 4-й группе животных (рис. 1). В костном мозге на 3-й день достоверный рост числа пронормобластов отмечался в группах с липосомальным и свободным ксимедоном в дозе 100 мг/кг, при этом уровень базофильных нормобластов в этих группах не отличался от исходного. На 7-й день лишь в группе с липосомальным ксимедоном в дозе 100 мг/кг уровень базофильных нормобластов был на 80% ниже исходного показателя ($p < 0,05$), а в группе со свободной формой ксимедона в дозе 100 мг/кг был в 2,6 раза больше, чем в 4-й группе крыс ($p < 0,01$) и не различался с изначальным показателем (рис. 2).

Мексидол в липосомальной и свободной форме в обеих исследуемых дозах не препятствовал развитию анемии на 3-й день после химиотерапии. Однако в группе с липосомальным мексидолом в дозе 50 мг/кг по сравнению со свободной формой количество эритроцитов было на 57% больше ($p < 0,05$). К 7-му дню показатели гемоглобина и эритроцитов в группах с липосомальным и свободным мексидолом также не отличались от таковых в 4-й группе животных (рис. 1). В костном мозге на 3-й день после химиотерапии достоверный рост числа пронормобластов был в группах с липосомальным мексидолом в дозе 25 мг/кг и свободным мексидолом в дозе 50 мг/кг. При этом уровень базофильных нормобластов в группах с липосомальным и свободным мексидолом в обеих исследуемых дозах не отличался от исходного (рис. 2). На 7-й день достоверный рост числа пронормобластов был отмечен в группах с липосомальным и свободным мексидолом в дозах 25 мг/мл и 50 мг/кг на фоне исходных значений полихроматофильных и оксифильных нормобластов. Число базофильных нормобластов на фоне липосомального мексидола 25 мг/кг и его свободной формы в обеих исследуемых дозах не различалось с изначальным значением, а при введении липосомальной формы в дозе 50 мг/кг было на 78% ниже, чем у крыс интактной группы ($p < 0,05$, рис. 2).

Таким образом, дозы липосомальных форм ксимедона 50 мг/мл и мексидола 25 мг/кг соответственно более стабильно уменьшают эритропоэзсупрессивный эффект комбинации «доксорубин + циклофосфамид» в липосомальной форме. Липосомальные ксимедон в дозе 100 мг/кг и мексидол в дозе 50 мг/кг кратковременно (на 3-и сутки после химиотерапии) способствуют росту числа базофильных нормобластов в костном мозге, однако уже к 7-м суткам их содержание снижается до уровня животных 4-й группы. При этом ксимедон и мексидол в свободной форме в исследуемых дозах снижают эритропоэзсупрессивное действие липосомальных цитостатиков на всем протяжении опыта. Однако в группах с липосомальными и свободными ксимедоном и мексидолом положительная динамика восстановления эритропоэза не сопровождается уменьшением выраженности анемии.

Сочетанное введение липосомальных ксимедона (50 мг/кг) и мексидола (25 мг/кг) не препятствовало развитию анемии на 3-й день после химиотерапии, однако уже к 7-му дню содержание эритроцитов и гемоглобина увеличивалось на 43% и 33,6% соответственно

($p < 0,05$) по сравнению с показателями в 4-й группе животных (рис. 1). В костном мозге исследуемые показатели эритропоэза на 3-й день после химиотерапии не различались с таковыми интактных животных, за исключением базофильных нормобластов, содержание которых снижалось на 89% ($p < 0,05$). К 7-му дню отмечались восстановление исходного количества базофильных нормобластов (3-кратный прирост в сравнении с 4-й группой, $p < 0,05$), нарастание содержания полихроматофильных нормобластов на 85% ($p < 0,05$) по сравнению со здоровыми крысами (прирост на 80% в сравнении с 4-й группой, рис. 2) и тенденция к росту числа оксифильных нормобластов.

Заключение. Таким образом, липосомальная комбинация «доксорубицин + циклофосфамид», в отличие от свободной формы цитостатиков, менее выражено и более плавно угнетает эритропоэз. Липосомальные ксимедон и мексидол не имеют преимуществ перед свободной их формой в коррекции угнетения эритропоэза, вызванного липосомальными цитостатиками. При этом положительная динамика восстановления эритропоэза не сопровождается уменьшением выраженности анемии в исследуемые сроки. Комбинация липосомальных форм ксимедона и мексидола, в отличие от раздельного введения их липосомальных и свободных форм, снижает тяжесть анемии на 7-й день после химиотерапии с увеличением уровня гемоглобина (на 33,6%) и эритроцитов (на 43,4%) в периферической крови в сочетании с ростом доли базофильных (в 3 раза) и полихроматофильных нормобластов (на 80%) в костном мозге у крыс с карциномой Walker-256.

Список литературы

1. Tecza K., Pamula-Pilat J., Lanuszewska J., Butkiewicz D., Grzybowska E. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Oncotarget*. 2018. Vol. 9. № 10. P. 9114-9136.
2. Ouyang Z., Peng D., Dhakal D.P. Risk factors for hematological toxicity of chemotherapy for bone and soft tissue sarcoma. *Oncology Letters*. 2013. Vol. 5. № 5. P. 1736-1740.
3. Кулик Г.И., Пивнюк В.М., Носко М.М., Тодор И.Н., Чехун В.Ф. Липосомальные препараты: путь к преодолению лекарственной устойчивости к цисплатину // *Онкология*. 2009. Т. 11. № 1. С. 76-80.
4. Pham T.D., Ma W., Miller D., Kazakova L., Benchimol S. Erythropoietin inhibits chemotherapy-induced cell death and promotes a senescence-like state in leukemia. *Cell Death and Disease*. 2019. Vol. 10. № 1. P. 22.
5. Уланова Т.В., Инчина В.И., Шокина С.В., Семенова Е.В., Русейкин Н.С., Семенов А.В. Сравнение гипогликемической активности никотината 3-гидроксипиридина и его

липосомальной формы на фоне индуцированных дексаметазоном метаболических нарушений // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26316> (дата обращения: 26.01.2021).

6. Attia M., Essa E.A., Zaki R.M., Elkordy A.A. An Overview of the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Alpha Lipoic Acid (in Liposomal Forms) as Adjuvant in Cancer Treatment. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9. № 5. P. 359.

7. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition / Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; Institute for Laboratory Animal Research (ILAR); Division on Earth and Life Studies (DELS); National Research Council of the national academies. Washington: The National Academies Press, 2011. 246 p.